

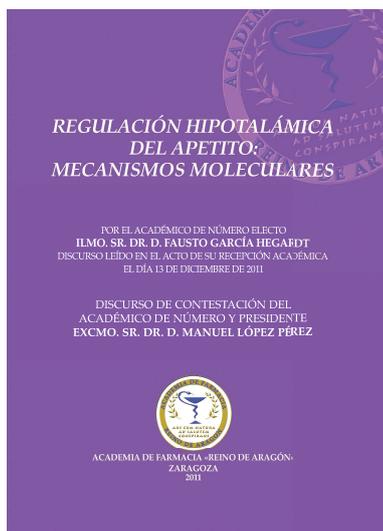
REGULACIÓN HIPOTALÁMICA DEL APETITO: MECANISMOS MOLECULARES

POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO ELECTO
ILMO. SR. DR. D. FAUSTO GARCÍA HEGARDT
DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN ACADÉMICA
EL DÍA 13 DE DICIEMBRE DE 2011

DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL
ACADÉMICO DE NÚMERO Y PRESIDENTE
EXCMO. SR. DR. D. MANUEL LÓPEZ PÉREZ



ZARAGOZA
2011



Edita

Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza

Distribuye

Academia de Farmacia «Reino de Aragón»

Imprime

Huella Digital

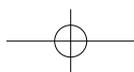
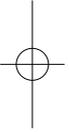
Polígono Industrial «El Portazgo», nave 62A, Carretera de Logroño km 3,700

Depósito Legal:

Z-4122/2011

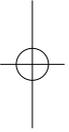
Sumario

| | |
|--|----------|
| <i>Discurso de recepción Académica</i> | |
| Ilmo. Sr. Dr. D. Fausto García Hegardt..... | 5 |
| REGULACIÓN HIPOTALÁMICA DEL APETITO: MECANISMOS MOLECULARES | 9 |
| <i>Discurso de Contestación</i> | |
| Excmo. Sr. Dr. D. Manuel López Pérez..... | 37 |



Discurso de recepción Académica

Ilmo. Sr. Dr. D. Fausto García Hegardt



I



Excelentísimo Sr. Presidente de la Academia de Farmacia “Reino de Aragón” y Magnífico Rector de la Universidad de Zaragoza,

Ilustrísimo Sr. Vice-Presidente Fundador de la Academia de Farmacia “Reino de Aragón”,

Miembros de la Junta Directiva y Académicos de esta docta Corporación,

Ilustrísim Sr. President de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya

Ilmo. Sr. Presidente del Colegio de Farmacéuticos de Zaragoza

Ilustres Colegas de la Universidad,

Querida familia y Queridos amigos,

Señoras y Señores,

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Junta Directiva de esta ilustre Corporación por haber permitido que ingrese como Académico Numerario, y también por haberme ofrecido la posibilidad de dictar el Discurso de Apertura del Curso Académico de la Academia de Farmacia Reino de Aragón en el año 2011. Una ciudad tan abierta a la ciencia y a los temas de salud como Zaragoza necesitaba de esta Corporación para alentar y encauzar los estudios farmacéuticos desde la óptica de un continuo estímulo científico y de profundización en los mecanismos que ayudan a mantener a los conciudadanos en un óptimo estado de salud. Esta Academia de Farmacia Reino de Aragón está contribuyendo a fomentar la investigación farmacéutica moderna que se verá aumentada en un próximo futuro con las oleadas de Licenciados y Doctores en Farmacia que se originarán en Zaragoza tras haberse implantado los estudios universitarios de la especialidad.

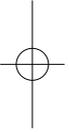
En lo que a mí respecta, me siento de la misma manera como se sentía el centurión que narra el Evangelio de San Mateo (Cap. 8, Vs 5). Digo las mismas palabras: *Domine, Non sum dignus*. Si bien Licenciado en Química en esta Universidad de Zaragoza, mi incorporación en 1973 a la Facultad de Farmacia de Barcelona, me permitió captar el espíritu farmacéutico en tantos años de convivencia con colegas Licenciados y Doctores en Farmacia, de

tal suerte que me he movido en aquel ambiente como uno más. Posteriormente, el ingreso en la Academia de Farmacia de Cataluña en el año 2000, completó mi visión sanitaria desde la perspectiva farmacéutica, que matizó el desarrollo bioquímico de mi profesión.

En estas breves palabras introductorias quisiera agradecer a todos los que de una u otra manera me han ayudado a llegar hasta aquí. Quiero recordar a mis maestros de la Licenciatura, a los Profesores que me dirigieron la Tesis Doctoral, a los que me dirigieron mis estudios post-doctorales entre los que se encontró el Premio Nobel ya fallecido Henrik Dam de Dinamarca, a los integrantes de mi equipo investigador, entre los que se cuentan los 36 a los que dirigí su Tesis Doctoral, los miembros que forman el Equipo de investigación actual, que hacen que mantengamos unos estándares de calidad, que es bien apreciado por diversas instancias internacionales. De corazón lo digo, sin su concurso, no habiéramos alcanzado las cotas que estamos consiguiendo. En este capítulo de agradecimientos no quisiera obviar a mi esposa, que es la que me sostiene el ánimo, cuando las cosas no vienen bien dadas, por no tener los becarios que deseáramos, o la financiación a la que aspiramos, o cuando los resultados no acompañan al esfuerzo puesto en la tarea investigadora. A ella quiero dedicar estas palabras de agradecimiento como estrecha colaboradora del andar diario por la vida.

Este es un día feliz al unirse varias circunstancias tales como ser aceptado en esta institución de mi ciudad, hacerlo en el ámbito farmacéutico y desarrollando como tema de ingreso lo que es objeto de nuestros estudios de investigación bioquímica. A ello se une coyunturalmente el hacer este acto en la Real Academia de Medicina de Zaragoza, de la que formo parte como Académico Correspondiente y de la que formaron parte antepasados míos ejerciendo tareas de responsabilidad al frente de la institución. El Presidente de la Academia de Medicina a comienzos del siglo XX fue un hermano de mi bisabuelo D. Gregorio Antonino García Hernández, que ejerció su Presidencia en dos momentos distintos (1897-1900) y (1902 hasta su fallecimiento acaecido en 1913). También mi abuelo D. Augusto García Burriel perteneció a esta Academia desde 1905 y fue elegido Secretario General Perpetuo desarrollando su labor excelentemente desde 1908 hasta 1921. Todo un cúmulo de circunstancias emotivas, que hacen de hoy un día particularmente feliz.

***REGULACIÓN HIPOTALÁMICA
DEL APETITO:
MECANISMOS MOLECULARES***



I



El tema que he elegido para mi discurso de ingreso se gestó, como tema investigador de mi grupo, en una Seminario que escuché en Boston en abril de 2005, año que estaba haciendo una estancia sabática en el Institute Joslin of Diabetes de la Harvard Medical School de la Universidad de Harvard. La Dra. Silvana Obici de la Albert Einstein University de New York había sido invitada por el Children's Hospital y desarrolló el tema de regulación del apetito a través de la actuación de varios sensores bioquímicos en el cerebro. Una de la proteínas encargadas de la sensorización del estado energético del organismo era la Carnitina Palmitoil Transferasa 1A (comúnmente denominada CPT1A), que era el gen y la proteína en la que nosotros somos especialistas, por lo que pensé que nuestro grupo, a mi vuelta del sabático podía aportar su experiencia con el citado enzima en la regulación del apetito. Ello hizo que comenzásemos en 2006 una serie de estudios conducentes a ver la implicación de la CPT 1A y del metabolismo lipídico en general en la modulación del apetito.



I



OBESIDAD

La obesidad es definida como un estado fisiopatológico en que el exceso de acumulación de grasas en el tejido adiposo produce problemas de salud (1-5). En el mundo desarrollado y en los países en desarrollo, los niveles de obesidad y de las patologías relacionadas está aumentando a una velocidad que está adquiriendo proporciones epidémicas. Casi uno de cada tres adultos en los Estados Unidos se le podría definir como clínicamente obeso, esto es, que su índice de masa corporal es superior a 30 kg/metro cuadrado de su cuerpo. Los aumentos de prevalencia de la obesidad en otros países desarrollados están subiendo de un modo alarmante debido al estilo de vida americano que podríamos denominar como westernización. La obesidad es en estos momentos una pandemia global mundial. Las consecuencias de esta situación no son solamente sociales y psicológicas sino que también tienen asociadas consecuencias de elevada morbilidad y mortalidad. La obesidad predispone a padecer diabetes tipo 2, hipertensión, infarto de miocardio y angina de pecho y varias formas de cáncer (6). Si el incremento de pacientes obesos sigue la cinética actual, la obesidad pronto será considerada como el factor de riesgo de mortalidad mayor en todo el mundo y en particular en los Estados Unidos, sobrepasando al consumo de tabaco. Esto no solamente es cierto en adultos, sino también en niños cuya correlación con la reducción en expectativa de vida es incluso mayor que en los adultos.

La industrialización y sus consecuencias económicas han conducido a la población a asentarse en ciudades, aumentado sus hábitos sedentarios. Ello, acoplado a la facilidad de obtención de alimento que se ha producido en parte por la globalización, ha hecho que la reducción del gasto energético unido al aumento en ingesta calórica ha contribuido a lo que se denomina "entorno obesogénico". En este sentido, el exceso de grasa no debe considerarse como una enfermedad (una condición que es debida a una anomalía biológica individual) sino que es una adaptación colectiva a una presión del entorno patológico para comer demasiado y hacer demasiado poco ejercicio.

A pesar de que el balance energético puede ser afectado por muchos factores reguladores, la obesidad es en último término, el resultado de un imbalance entre adquisición de energía y gasto energético. Cuando la can-

tividad de energía incorporada por el individuo iguala el gasto energético, el resultado es un balance de energía neutro que permite una estabilidad en el peso del cuerpo (7).

Suponiendo que la absorción de energía eficiente del tracto gastro-intestinal es normal, el límite de energía que puede ser asimilada es equivalente a la energía consumida como alimento. En casos de ingreso de alimento reducido tales como en situación de ayuno, se produce una respuesta del organismo intentando conservar los depósitos grasos, mediante incremento en los deseos de comer. De hecho, esta contra-regulación que es tan frustrante para los dietistas, es una consecuencia del hecho de que se activa el mecanismo de defensa del organismo por el intento consciente de perder peso. Sin embargo, a pesar de esas respuestas homeostáticas para mantener el balance energético, el exceso hiper-calórico y la reducción del ejercicio puede degradar la eficiencia de estos mecanismos reguladores. De hecho, el envejecimiento y los efectos tóxicos de la sobre-nutrición pueden actuar sinérgicamente para disminuir la eficiencia de estos mecanismos homeostáticos. En este momento, el imbalance en la ecuación energética produce obesidad y con el tiempo un progresivo desarrollo de la resistencia a la insulina y de la diabetes tipo 2 (7).

Regulación hipotalámica de la alimentación

El sistema nervioso central recibe infinidad de información, tal como la experiencia sensorial de comer, el proceso de la ingestión, el de absorción, el metabolismo y también el de los niveles de acumulación energética. El hipotálamo es un área especializada del cerebro consistente en unos clústers de neuronas definidas anatómicamente como núcleos, que integran por una parte, el control de homeostasis energética y por otra, la regulación del apetito. Los núcleos hipotalámicos forman circuitos neuronales interconectados a través de proyecciones axonales. Estos núcleos responden a cambios en el estatus de energía alterando la expresión de neurotransmisores específicos (llamados también neuromoduladores) determinando cambios en el ingreso energético y en el gasto energético (8-10).

Al núcleo arcuato se le considera como el centro hipotalámico master para el control del alimento. Esta situado alrededor de la base del tercer ventrículo y cae inmediatamente por encima de la eminencia mediana, donde se encuentra la barrera hemato-encefálica que discrimina qué com-

puestos sanguíneos deben entrar al cerebro y cuáles no. Esta barrera, no obstante, permite la entrada de determinados péptidos y proteínas desde la circulación sanguínea, tales como la leptina, la ghrelina y la insulina con acción sobre el apetito. Para su acción reguladora del apetito el núcleo arcuato dispone de dos conjuntos de neuronas especializadas en integrar las señales nutricionales y de alimentación. Un conjunto de neuronas localizadas en la parte ventromedial del arcuato expresa los neuropéptidos orexigénicos (promotores de apetito) tales como la proteína relacionada con el agouti (en siglas AgRP) y el neuropéptido Y (NPY). Estas neuronas se proyectan en su mayor parte a otras neuronas de segundo orden, localizadas en otras zonas hipotalámicas tales como el núcleo paraventricular. En la zona ventrolateral del arcuato se encuentran otro conjunto de neuronas que expresan los productos anorexigénicos como pro-opiomelanocortina (POMC), el precursor de la hormona estimulante de alfa melanocitos (α-MSH) y el transcrito regulado de cocaína y anfetamina (CART): Este conjunto de neuronas se proyecta más extensamente hacia el sistema nervioso central, a través del núcleo dorsomedial, el área lateral hipotalámica, el área perifórnica y el núcleo paraventricular.

Habitualmente, las neuronas AgRP/NPY y CART/POMC actúan como el sitio primario de acción hipotalámica de las hormonas periféricas tales como la insulina y la leptina. Dependiendo de las señales recibidas desde el arcuato, las neuronas de segundo orden promueven la liberación de los neuropéptidos utilizados para modular el apetito (9-14).

En la parte posterior el arcuato se encuentra el núcleo ventromedial del hipotálamo. Durante mucho tiempo al núcleo ventromedial se le consideró como el centro de la saciedad puesto que lesiones bilaterales en este núcleo inducían hiperfagia y obesidad (15). El núcleo ventromedial habitualmente recibe proyecciones de las neuronas AgRP/NPY y CART/POMC del arcuato. Además, las neuronas del núcleo ventromedial proyectan sus axones al arcuato, dorsomedial y lateral, así como al cerebelo y al núcleo del tracto solitario (16). El núcleo ventromedial parece ser el núcleo receptor de señales centrales y periféricas puesto que las neuronas de este núcleo muestran una alta abundancia de receptores para la leptina, ghrelina, estrógenos, hormona tiroidea y otros neuropéptidos (17). A pesar de que se han identificado estos efectores, sus efectos a la hora de marcar pautas de apetito no son concluyentes. Se conoce, no obstante que las neuronas de esta zona expresan la ácido graso sintetasa y que poseen niveles importantes de malonil-CoA (18).

La señalización existente entre la periferia y el cerebro

El cerebro y el sistema nervioso central se enteran de la situación nutricional del organismo a través de señales periféricas circulantes. Según la índole de estas moléculas, las hipótesis de acción sobre el sistema nervioso central se denominan glucostáticas, lipostáticas o aminostáticas. Estos modelos proponen que moléculas (generalmente pequeñas) que circulan a través de la sangre señalan la disponibilidad energética del organismo. Las más clásicas eran la glucosa, los ácidos grasos y la insulina. Más recientemente, se han unido a ellas pequeñas estructuras peptídicas liberadas por el tejido adiposo que resultan muy eficaces por la capacidad de información que generan. Entre ellas, la más famosa es la leptina, descubierta en 1994 (20), pero que ha sido seguida del descubrimiento de su receptor (21) y de otros péptidos como adiponectina (22), visfatina (23), resistina etc, cada una llevando información de cómo debe reaccionar el cerebro a la situación energética global. Que el hipotálamo tenía relación con el estado glucogénico del organismo se conoce desde 1855 en que el científico francés Claude Bernard produjo un estado generalizado de glucosuria o eliminación de glucosa por la orina (por la generación de una diabetes tipo 2) en el perro al pinchar y destruir la base del cuarto ventrículo cerebral con una aguja (24).

El descubrimiento de la leptina en 1994 por Friedman (20) supuso un salto cuantitativo hacia adelante en la comprensión de los fenómenos de modulación del apetito, y de la regulación de la producción hepática de glucosa. La deficiencia de leptina o de sus receptores funcionales conduce a una obesidad profunda, a resistencia a la insulina y a otras desregulaciones endocrinas. Cuando a ratones *ob/ob*, que son ratones con una mutación seria en el gen de la leptina se les suministra exógenamente leptina, los ratones pierden peso y normalizan su diabetes y su obesidad (25,26). Así mismo la dosificación de leptina a ratones lipodistróficos normaliza su glucemia y mejora la homeostasis de glucosa (27). De la misma manera, cuando se hace terapia viral con el gen de los receptores de leptina a ratones que son defectuosos en los genes de estos receptores, se mejora considerablemente la hiperglucemia e hiperinsulinemia, si bien hay pocos cambios en la generación de apetito o en pérdida de masa grasa.

En lo que queda de discurso iré detallando las acciones moleculares que causan modificaciones en el apetito y en la síntesis hepática de glucosa por la influencia directa de sustancias energéticas, tales como ácidos grasos y glucosa y de hormonas reguladoras del peso y del metabolismo tales como la insulina, la leptina y la ghrelina.

Efecto de los ácidos grasos hipotalámicos en la regulación del apetito

Además de los efectos producidos por los péptidos hormonales descritos, principalmente insulina y leptina, una parte sustancial de los mecanismos de regulación del apetito y de la síntesis hepática *de novo* de glucosa se producen por la acción de los ácidos grasos, según se postula en la hipótesis lipostática. Desde 1980 se sabe que los tratamientos de emulsiones lipídicas periféricas por vía endovenosa producían efectos anorexigénicos (supresores del apetito). No obstante la naturaleza molecular específica de las moléculas señales permanecieron sin identificar hasta muy recientemente, en que el Dr. Luciano Rossetti y sus colegas de la Universidad Albert Einstein de New York en una serie de elegantes trabajos (28,29) mostraron como los ácidos grasos actúan en los centros hipotalámicos modulando el apetito. Así, la administración intracerebroventricular de ácido oleico inhibía el apetito, cosa que no sucedía con ácidos grasos de cadena media tal como el octanoico. Este hecho ponía de manifiesto que probablemente en el proceso participaba la CPT1A porque los ácidos grasos de cadena media no necesitan ser transportados al interior de la mitocondria por este transportador CPT1A. Así mismo, se puso de manifiesto la necesidad de que los ácidos grasos tuvieran que trans-esterificarse a sus derivados de Coenzima A pues la inhibición de esta etapa por la triacsina C, que es un inhibidor de la acil-CoA sintetasa, evitaba la pérdida de apetito (30).

Los efectos anoréxigénicos del ácido oleico se ejercen fundamentalmente en el núcleo arcuato donde se produce la disminución de la expresión de los genes orexigénicos AgRP y NPY (28,29). Por el contrario, la expresión de los genes anorexigénicos POMC y CART no se afectó por el ácido oleico, indicando que la acción anorexigénica de los ácidos grasos de cadena larga está mediada sólo por la inhibición de los genes orexigénicos (29). Este experimento permite suponer que las oscilaciones de los niveles de ácidos grasos sanguíneos es el mecanismo natural para inducir o reprimir apetito. La implicación de la CPT1A en la regulación del apetito se constata por el hecho de que la inhibición de la CPT1A conduce a una disminución notable del apetito y a una represión en la expresión de los genes NPY y AgRP en el arcuato. Aunque parezca un pleonasma, nosotros este efecto lo hemos visto con nuestros propios ojos en un experimento en que sobre-expresamos el gen de la CPT1A en el núcleo ventromedial mediante la inyección de virus adeno-asociados que contenían el cDNA del gen *cpt1a*. El resultado fue que los animales comían más cantidad de comida, ganaban peso y

se volvían resistentes a insulina, aumentando las concentraciones de glucosa y de insulina en sangre. Ello permite formular una especie de correlación axiomática en el sentido que cuando la actividad CPT1A aumenta, aumenta también el apetito y cuando esta actividad es inhibida, bien sea por inhibidores específicos (tales como C75-CoA o ST1326), o por ribosondas específicas, el animal come menos o nada.

Los ácidos grasos se utilizan en el metabolismo celular para una amplia variedad de funciones, tales como formación de membranas, modificación proteica y generación de moléculas señal. Estos ácidos grasos provienen o bien de la dieta o por síntesis *de novo*.

El enzima más importante en la síntesis de ácidos grasos es la ácido graso sintetasa (en siglas FAS del término inglés fatty acid synthetase). Los mamíferos tienen esta actividad en todas las células y también en las neuronas. La síntesis de ácidos grasos comporta un conjunto de reacciones iterativas para sintetizar ácido palmítico. La FAS hace reaccionar al acetyl-CoA y malonil-CoA como un sistema de ir haciendo que la molécula del ácido graso vaya aumentando de longitud de dos en dos unidades. El acetyl-CoA se produce como consecuencia del metabolismo de la glucosa por decarboxilación del piruvato causado por la piruvato deshidrogenasa. Esta reacción que conduce al acetyl-CoA a la mitocondria determina en la mayoría de las situaciones, la destrucción del acetyl-CoA a CO₂ y H₂O y obtención de energía por la oxidación de los equivalentes de reducción de la FADH₂ y de NADH en la cadena de transporte electrónica. Pero si la situación metabólica es la apropiada, el acetyl-CoA puede reorientarse hacia la síntesis de ácidos grasos, para lo cual, y dado que esta síntesis se verifica en el citosol, obliga al acetyl-CoA a salir de la mitocondria, cosa que realiza a través de su conversión previa en citrato. Tras dos reacciones seguidas, el citrato se convierte en acetyl-CoA y luego en malonil-CoA por la acción de dos enzimas citosólicos ATP-citrato liasa y acetyl-CoA carboxilasa. El malonil-CoA juega un papel decisivo en la regulación del apetito de suerte que se puede establecer otra correlación axiomática en el sentido que aumentos de malonil-CoA conducen a una disminución del apetito y, disminuciones también de los niveles de malonil-CoA hipotalámicos suponen aumentos del apetito.

Existe una cierta controversia acerca de si los niveles de malonil-CoA hipotalámicos son *per se* los responsables de la regulación del apetito o su función es mediada por las carnitina palmitoil transferasas. Se conoce desde 1978 que el malonil-CoA es el inhibidor fisiológico más notable de la acción CPT1A, y a través de esa acción inhibitoria puede regularse la acti-

vidad CPT1A que, como ya he comentado antes, también es responsable de la ganancia o pérdida de apetito. Alternativamente, podríamos considerar que el malonil-CoA o un derivado suyo interacciona directamente con una proteína señalizadora que regulase la expresión de los neuropéptidos. Ambas hipótesis son válidas pues las evidencias actuales son en sí mismas, indirectas. La participación del malonil-CoA en la regulación del apetito a través de su inhibición sobre la CPT1A es la evidencia más notoria de la participación de esta carnitina acetil transferasa toda vez que el bloqueo de la expresión del gen *cpt1a* por sí mismo produce los efectos inhibitorios del apetito, sin que el malonil-CoA haya cambiado.

La hipótesis de la participación de la CPT1A, no obstante, se ha de matizar pues, dependiendo de las neuronas en las que se expresa la CPT1A, el resultado es distinto. Nuestro grupo, en colaboración con el grupo del Dr. Gary Lopaschuk de la Universidad de Alberta en Edmonton, Alberta, Canadá ha publicado muy recientemente un interesante artículo en el Proceedings of the National Academy of Sciences de USA (31) en el que se muestra que la CPT1A no ejerce ninguna función reguladora del apetito en el núcleo arcuato, pero sí que la ejerce en el núcleo ventromedial, y esta matización fisiológica-funcional puede ser crucial para las sutiles interacciones que se establecen entre núcleos hipotalámicos en función de las señales hormonales, nutricionales o farmacológicas que reciban por vía sanguínea. Obtuvimos también resultados complementarios en los que se mostraban que el malonil-CoA por sí solo es capaz de inhibir el apetito en el arcuato, sin que concurra la CPT1A a la acción anorexigénica (32).

Es interesante, a este respecto, mencionar que además de la Carnitina Palmitoil Transferasa 1A que he venido describiendo a lo largo de esta disertación, existe otra Carnitina Palmitoil Transferasa específica de cerebro, la llamada 1C, descubierta en 2003. cuya función exacta no es bien conocida aún, pero que la evidencia acumulada por nuestro grupo y por otros autores supone que también participa en los fenómenos de regulación del apetito (33,34). Esto se demuestra por el hecho de que los animales KO de este gen, es decir aquellos animales a los que se ha anulado el gen, tienen menor apetito y ganan menos peso que los animales control. La CPT1C es una proteína un tanto extraña, pues no tiene actividad Carnitina Palmitoil Transferasa, por lo que no se puede hablar de que sea un enzima activo. Sin embargo, su estructura espacial es análoga a la de la CPT1A y tiene como ella, un centro catalítico y un centro alostérico para el malonil-CoA prácticamente idénticos a los de la CPT1A. Se van acumulando evi-

dencias en la participación de la CPT1C en los fenómenos regulatorios del apetito, así como del mantenimiento de la glucemia sanguínea y de la sensibilidad a la insulina. Por otra parte, la CPT1C es capaz de ligar malonil-CoA como la CPT1A y esta puede ser una de sus funciones más notables en el conjunto de sutilezas metabólicas y funcionales de las neuronas en las que se expresa. Nuestro grupo ha mostrado que en el núcleo arcuato la sobre-expresión de la CPT1C a través de adenovirus modificados conduce a un aumento del apetito, cosa que no sucede con la CPT1A en ese núcleo hipotalámico, aunque en el núcleo ventromedial sí que se producen aumentos de apetito por aumentos en la expresión de la CPT1A (32).

Experimentos del grupo del Dr. Wolfgang en la Johns Hopkins University han mostrado que la sobre-expresión de la CPT1C en el tercer ventrículo conduce a aumentos de apetito y que esta sobre-expresión en animales obesos mejora su situación de diabetes (34). Esto pone de manifiesto que esta proteína controla mecanismos metabólicos más allá del cerebro, probablemente a través de la vía neural del nervio vago, modificando la gluconeogénesis.

Resulta muy interesante, por otra parte constatar que a la par que determinados efectores nutricionales u hormonales modifican el apetito por su acción en el hipotálamo, a la vez se modifica la síntesis de glucosa en el hígado. Es bien sabido que el cerebro necesita un total de 100 gramos diarios de glucosa y que la sangre solo contiene 1 gramo por litro de glucosa (6 gramos en el total de los 6 litros). De ello se infiere que debe haber mecanismos metabólicos bien establecidos que suministren glucosa a la sangre continuamente, para evitar carencias que resultarían letales. El hígado es el órgano principal de suministro de glucosa, y ello lo logra a través de dos mecanismos. 1) La degradación del glucógeno acumulado en el propio órgano y 2) la síntesis *de novo* a partir de sustancias no glucogénicas, en un proceso que se denomina gluconeogénesis. La gluconeogénesis es un proceso muy activo en los momentos en que no hay ingreso de alimento (singularmente por la noche).

Investigaciones recientes han mostrado que la elevación de los niveles hipotalámicos de ácidos grasos de cadena larga, bien por administración de ácido oleico o por inhibición de la CPT1A produce una disminución importante en la síntesis de glucosa en el hígado. Este efecto metabólico precisa la esterificación de los ácidos grasos a aciles-CoA así como que el nervio vago se encuentre en perfecto estado y también que los canales de potasio-ATP hipotalámicos estén muy activos (35).

Como he comentado la actividad CPT1 es regulada por malonil-CoA, que se genera a partir del acetyl-CoA por la acción de acetyl-CoA carboxilasa, siendo esta etapa muy importante por cuanto no sólo va a servir para iniciar la síntesis *de novo* de ácidos grasos, como el palmítico, sino que a la vez va a frenar la oxidación de los ácidos grasos ya formados para la obtención de energía.

No solamente es necesaria la concentración adecuada de aciles-CoA en el hipotálamo para la inhibición de la síntesis de glucosa en el hígado, sino que también los canales de potasio-ATP han de verse abiertos e intactos. Esto se puso de manifiesto, cuando en un experimento, además de introducir en el hipotálamo ácido oleico se añadió también glibenclamida que es un bloqueante del canal de potasio (36,37). El resultado fue, que no se inhibió la gluconeogénesis hepática, a pesar que se daban todas las circunstancias para que esto ocurriera. El papel del canal de potasio hipotalámico en la homeostasis de glucosa hepática se corroboró al examinar los resultados de la obtención de ratones KO de la subunidad Sur1 del canal de potasio hipotalámico: No había inhibición de la síntesis de glucosa en el hígado, ni en las condiciones más óptimas para que esto funcionara (37). El cuadro global de la regulación homeostática de la glucosa en hígado por acción hipotalámica se completó con la adición de triacsina C a la par que ácido oleico en el hipotálamo de rata. El resultado fue, que se había abolido la regulación de la homeostasis de glucosa hepática. Al ser este producto, triacsina C un inhibidor de la acción de la acil-CoA sintetasa, resultó claro que es necesaria la presencia de aciles-CoA hipotalámicos para que los procesos homeostáticos hepáticos se pusieran en movimiento. En conjunto, estos estudios ilustran que los ácidos grasos de cadena larga pueden regular la homeostasis de glucosa a través de un mecanismo hipotalámico que depende 1) De la esterificación de ácidos grasos de cadena larga a sus derivados de Coenzima A, 2) De la existencia de canales de potasio-ATP intactos y abiertos, 3) De la actuación del nervio vago que debe estar intacto y operativo.

De un modo redundante, se puede comentar que la presencia de malonil-CoA es necesaria para modular también este proceso. Como se ha señalado, el malonil-CoA presente inhibe la actividad CPT1A y de esta manera los niveles de aciles-CoA permanecen elevados. Este hecho también se ha corroborado por la destrucción de los niveles de malonil-CoA a través de la malonil-CoA decarboxilasa introducida en el hipotálamo por la inyección de adenovirus que contengan su cDNA. La desaparición de malonil-CoA

conduce a una disminución de aciles-CoA que han sido metabolizados por la CPT1A, y por ello ha desaparecido la señal inhibitoria que ha de regular la síntesis de glucosa en el hígado (38).

Recientemente, el grupo del Dr. Wolfgang de la Johns Hopkins University ha probado que la activación de la proteína kinasa C hipotalámica hace disminuir la producción de glucosa hepática. Ello indica que esta actividad kinasa es un nuevo intermediario de los procesos bioquímicos hipotalámicos para controlar la homeostasis de la glucosa hepática. Asimismo la PKC es un determinante necesario en el proceso de instauración del apetito (39).

Regulación del apetito y de la gluconeogénesis hepática causadas por la glucosa circulante

La glucosa es un combustible energético obligado y necesario para sostener toda la actividad neuronal. Prácticamente, la obtención de ATP por vía metabólica en las neuronas procede del metabolismo de la glucosa. En una proporción mucho menor, los cuerpos cetónicos también proporcionan energía metabólica cerebral. La glucosa es extraída de la circulación general cuando se transporta a través de la barrera hemato-encefálica por el transportador de glucosa GLUT1 que se encuentra en las células endoteliales micro-vasculares de la barrera hemato-encefálica y se distribuye entre las membranas luminales y ab-luminales y el pool intracelular. La presencia de GLUT1 en la membrana ab-luminal de las células endoteliales facilita la salida y subsiguiente trasvase al espacio extracelular cerebral. De allí, la glucosa puede entrar en las neuronas a través de transportadores de glucosa GLUT3 que tienen una mayor capacidad de transporte que el GLUT1 (40,41).

La glucosa comienza su labor metabólica transformándose en piruvato a través de la glucólisis. En condiciones aeróbicas, típicas del cerebro el piruvato 1) O bien se oxida por el complejo piruvato deshidrogenasa formando acetil-CoA o 2) Se carboxila por la piruvato carboxilasa para formar oxalacetato, que entra en el ciclo de Krebs produciendo citrato. También el piruvato se transforma en lactato, tal como se deduce de la medición de consumo relativo de glucosa y de oxígeno, que resulta ser éste, estequiométricamente menor que el consumo de glucosa.

El lactato también puede producirse en las células gliales (astrocitos) a través de la glicolisis no oxidativa (42). Allí, se produce la lanzadera (shuttle) de lactato entre astrocitos y neuronas, Este no es un proceso cuantitativamente menor, pues se ha observado que es mayoritario, no solamente para regular el apetito sino para regular la síntesis de glucosa en el hígado. La confirmación del lactato como compuesto intermedio en el metabolismo de la glucosa en las neuronas, se ha confirmado a través de experimentos de inyección intracerebroventricular de lactato que produce pérdidas de apetito y disminución de la producción hepática de glucosa (43). También resultan confirmatorios los resultados de infusión de oxamato que es un inhibidor de la actividad lactato deshidrogenasa, pues anula los efectos sobre el apetito y la producción de glucosa (43). Estos y otros experimentos parecidos muestran que la conversión de glucosa en lactato en astrocitos y su posterior transporte a neuronas hipotalámicas es un mecanismo indispensable para la regulación de la producción hepática de glucosa y bloqueo del apetito. Un experimento complementario mostró la necesidad de la conversión previa de piruvato a lactato, pues la infusión en el tercer ventrículo cerebral de dicloroacetato que es un inhibidor de la piruvato deshidrogenasa kinasa supuso la activación de la piruvato deshidrogenasa y el control de la formación hepática de glucosa (44).

La importancia del acoplamiento metabólico entre neuronas y astrocitos a través del tráfico intracelular de lactato en la regulación de la homeostasis de glucosa en el sistema nervioso central se completó con otros estudios complementarios. Así, cuando se perfundió el núcleo ventromedial del hipotálamo con lactato se paró en seco la respuesta hormonal contra-reguladora de la liberación de glucagón y de epinefrina (adrenalina). Iguales datos se obtuvieron si la perfusión del núcleo ventromedial se realiza con glucosa. Otros grupos investigadores llegaron a la misma conclusión perfundiendo en el cuarto ventrículo algunos inhibidores del transporte de monocarboxilatos (con acción sobre el lactato), cuyo resultado fue un aumento de los niveles sanguíneos de glucosa como consecuencia del bloqueo de todos los mecanismos de control de los procesos del apetito y de la producción de glucosa.

La producción de citrato descrita anteriormente como consecuencia de la entrada del piruvato en la mitocondria y conversión a acetil-CoA es el mecanismo donde confluyen los efectos reguladores del apetito y de la producción hepática de glucosa de los dos metabolismos: el de los ácidos grasos y el de la glucosa. Resulta sorprendentemente elegante la constatación

de la conjunción de las dos rutas metabólicas para lograr un efecto sumatorio de frenado del apetito o de la producción hepática de glucosa, cuando el organismo siente que la carga energética contenida en la sangre es suficientemente abundante como para evitar pérdidas de capacidad biosintética de un modo innecesario. En efecto, el citrato sale de la mitocondria por sí sólo y a través de la ATP-citrato liasa se convierte en acetil-CoA citosólico, que inmediatamente es transformado en malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa, regulando la oxidación de los ácidos grasos hipotalámicos, que resultan ser señales de gran contenido energético y capaces de modular la producción de apetito y de síntesis hepática de glucosa, como se detalló en el apartado anterior. Tras la presencia de los ácidos grasos está su conversión a aciles-CoA y éstos actúan activando las proteína kinasa C que es capaz de activar los canales de potasio-ATP, que movilizan la señal neural del nervio vago para activar la gluconeogénesis hepática bien por aumento en la expresión de genes específicos como de la activación de los propios enzimas gluconeogénicos. También la presencia de glucosa en el hipotálamo aumenta la expresión de los genes anorexigénicos POMC y CART y disminuye la expresión de genes orexigénicos NPY y AgRP (45). Esta acción es sorprendentemente coincidente con la inyección intra-hipotalámica de lactato, pues disminuye también la expresión del gen NPY y aumenta la expresión del gen POMC (46).

Por otra parte, es necesario enfatizar aquí que la acción hipotalámica le puede a la acción hepática en sí misma y así cuando la señal recibida por el hígado a través del nervio vago es frenar la síntesis de glucosa, cualquier otra señal hormonal o nutricional presente en la sangre que influya en el metabolismo hepático resulta pospuesta y frenada pues en el orden jerárquico de funciones reguladoras, la señal hipotalámica es mayoritaria y dominante sobre la del propio hígado.

ACCIÓN DE LA INSULINA EN EL CONTROL DEL APETITO

La insulina es un elemento central en el mecanismo de adiposidad y actúa como un anorexigénico potente en el hipotálamo para reducir el apetito e inducir también la pérdida de peso. De siempre era conocido que la insulina tiene una importante función en los tejidos periféricos al influir en el metabolismo de la glucosa a fin de que la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo se mantuviera controlada. No obstante en las últimas décadas se ha descubierto que la insulina no sólo actúa en tejidos periféricos sino en el sistema nervioso central también y con efectos muy vigorosos. Experimentos con ratones denominados NIRKO (*Neural Insulin Receptor Knock Out*) es decir ratones modificados genéticamente en los que se ha suprimido el gen del receptor de insulina específicamente en el sistema nervioso central muestran que se produce en ellos un cierto nivel de resistencia a la insulina, así como niveles de insulina plasmáticos elevados y un desarrollo de obesidad asociado con estos eventos (47). Esto sugirió que la señalización de insulina neuronal regula la homeostasis de glucosa periférica. Es importante constatar que cuando se inyecta insulina directamente en el tercer ventrículo cerebral se detiene inmediatamente la producción de glucosa en el hígado, y ello sucede independientemente de las alteraciones de peso del animal o de las variaciones en las concentraciones de hormonas gluco-reguladoras. El dominio homeostático ejercido por el hipotálamo en cuanto a regulación metabólica es férreo.

Es sabido que el mecanismo de acción de la insulina se produce inicialmente mediante su unión al receptor de insulina, una proteína tetramérica con funciones de tirosina quinasa. Esta unión transmite al interior de la célula la señal insulínica que inicia una cascada de reacciones bioquímicas, que suponen en primer lugar la fosforilación del sustrato del receptor de insulina, una proteína, que según el tejido en el que está actuando la insulina puede tener una isoforma distinta. A partir de ahí, la señal se diversifica para encauzarse en distintas cascadas que cubren diversas funciones: unas de modificación en la expresión de genes concretos, otra es para la fosforilación de enzimas clave del metabolismo, otra es para hacer participar la vía nutricional del mTOR (*mammalian target of rapamycin*) y otra para el traslado del transportador de glucosa a la membrana plasmática. Se ha observado que en las neuronas hipotalámicas funciona la vía de la fosfati-

dil 3 kinasa y proteína kinasa B. Notablemente, la ruta a través de las MAP kinasas no es funcional en estas neuronas. Otra singularidad de la señalización intracelular neuronal es la mayor participación del sustrato del receptor de la insulina, isoforma 2, más bien que la isoforma 1. Esta característica, tiene lugar no solo en el arcuato sino también en el núcleo paraventricular y en el ventromedial. Una vez que la señal se ha canalizado a través de la fosfatidil 3 kinasa discurre hasta la activación de los canales de transporte de potasio-ATP. Resultó muy fácil conocer este paso, pues la inyección de bloqueadores de estos transportadores de potasio (37) o la producción de ratones KO en la subunidad SUR1 / Kir6.2 del transportador, específicamente en el sistema nervioso central abolió los efectos de la acción insulínica (37). Al igual que otros experimentos que he mencionado anteriormente de la participación del nervio vago en la señalización de la supresión de la gluconeogénesis hepática por ácidos grasos, en estos experimentos en los que participa la insulina es necesario el concurso del nervio vago para llevar la orden desde el hipotálamo al hígado de suprimir la producción de glucosa.

Es sabido que la célula beta del páncreas en los islotes de Langerhans tiene canales de potasio que son muy sensibles para transmitir la señal de la secreción de insulina. En este caso, la traslocación de la señal se produce por el cierre de los canales de potasio. La participación de los canales de potasio en el arcuato funciona de manera distinta en cuanto a la promoción del apetito según sea la neurona en la que la señal insulínica está teniendo lugar, es decir, existen neuronas POMC y neuronas NPY, especializadas en cada caso para expresar los genes POMC y NPY respectivamente que determinan la liberación de estos neuropéptidos con acciones contrarias, de carácter anorexigénico u orexigénico respectivamente. Las interacciones entre estos conjuntos de neuronas de señales anorexigénicas u orexigénicas determina el balance final de tener apetito o no tenerlo. Es lo que se denomina el "tono melanocortino hipotalámico" (48), que es sumamente importante para la regulación de la homeostasis de glucosa y energía. Así, la activación directa del sistema melanocortino central por la administración hipotalámica de un agonista de melanocortina mejora la homeostasis de glucosa periférica (inhibiendo la producción hepática de glucosa). En sentido inverso, la administración intracerebroventricular de NPY o del antagonista del receptor de la melanocortina produce resistencia a la insulina independientemente de los cambios que tengan lugar en el apetito. Muy clarificador resulta el hecho de que la inyección intracerebroventricular de

NPY evita la inhibición de la producción de glucosa producida por la insulina circulante, sugiriendo que la disminución de la liberación de NPY es un pre-requisito para la acción de la insulina en su labor supresora de la producción hepática de glucosa (49). Esto lo realiza a través de la disminución de la expresión de los genes NPY y AgRP y por aumentar la expresión de POMC en el arcuato.

ACCIÓN DE LA LEPTINA EN LA SUPRESIÓN DEL APETITO Y EN LA SUPRESIÓN DE LA PRODUCCIÓN HEPÁTICA DE GLUCOSA

La leptina es una proteína pequeña de tan solo 167 aminoácidos, que es producida y secretada por el tejido adiposo. Desempeña un papel crucial en la homeostasis de la glucosa y en la regulación de la energía metabólica y, a nivel de hipotálamo reduce fuertemente el apetito y produce pérdida de peso porque disminuye la expresión de los genes orexigénicos NPY y AgRP, activando además la expresión de los genes anorexigénicos POMC y CART en el núcleo arcuato.

En un principio, los efectos sobre la homeostasis de la glucosa causados por la leptina se pensó que eran producidos por la pérdida de apetito y de la adiposidad, pero recientemente se ha observado que la leptina regula la homeostasis de la glucosa independientemente de sus efectos sobre la pérdida de peso. En su labor hipolipemiante, la leptina colabora con la insulina al disminuir la resistencia periférica de los tejidos a la acción de la insulina. Los Premios Nobel Goldstein y Brown obtuvieron unos ratones lipodistróficos al sobre-exresar el gen del factor de transcripción de la SREBP-1c (27). La lipodistrofia producida iba acompañada por una hipoleptinemia y una hiperinsulinemia que determinaba que los ratones fueran fuertemente diabéticos. La perfusión continua a través de una bomba peristáltica de leptina asociada a su cuerpo produjo la reversión del fenotipo diabético y a una profunda disminución de los niveles plasmáticos de glucosa e insulina.

Los efectos asociados a la leptina que se producen a lo largo de todo el cuerpo se evidencian mucho más cuando la leptina actúa en el hipotálamo. Así, la administración intracerebroventricular de leptina normaliza la producción hepática de glucosa y normaliza el apetito de los ratones con alta resistencia a la insulina producida por una alimentación con exceso de grasa (50). Además, estos efectos se logran con unas dosis notoriamente más bajas que las que se administran en sangre periférica. El núcleo hipotalámico en el que se manifiestan mejor los efectos de la leptina es precisamente el arcuato. Los mecanismos bioquímicos de actuación de la leptina en el arcuato son de dos tipos. Por una parte, activan la misma señalización que tiene lugar con la insulina es decir, la línea de la PI3 kinasa. Esto se puso de manifiesto porque la infusión hipotalámica de un inhibidor de la PI3 kinasa anulaba la mejora de la sensibilidad a la insulina producida por la restauración de receptores de leptina funcionales en ratas *fa/fa* que son deficientes en el receptor de la leptina (26). La actuación de la leptina a través de la PI3K parece producirse en neuronas especializadas, porque esta señalización tiene lugar en neuronas POMC pero no en neuronas NPY/AgRP.

La actuación molecular de la leptina, además de la línea antedicha de la PI3 kinasa, que es común a la de la insulina, tiene otro sitio de actuación, que en particular, es la de la ruta de la STAT3. La leptina se une a su receptor LRb que es un receptor análogo a los receptores de citoquinas de la clase I, y que tras su unión activa la unión de la Janus kinasa 2 (Jak2) a la tirosina 1138 del receptor de la leptina, que activa la fosforilación de proteínas específicas tal cual es la "Signal Transducer and Activator of Transcription 3", que abreviadamente denominaré STAT3 (51). La activación de STAT3 por fosforilación del aminoácido tirosina en posición 705 produce inmediatamente la formación de homodímeros que se translocan al núcleo para mediar la expresión de genes específicos que producen la supresión del apetito y también el freno de la producción de glucosa. Si, por ejemplo, se produce un ratón transgénico con una mutación en el receptor de la leptina LRb se instaura la resistencia a la insulina. Análogos resultados, que magnifican el papel del receptor de la leptina, se obtienen cuando se inyecta intracerebroventricularmente el inhibidor de STAT3 denominado STAT3 PI o se infecta el hipotálamo mediobasal con un mutante dominante negativo de STAT3.

Si bien la vía del STAT3 es una ruta muy activa para mediar la acción de la leptina en el hipotálamo, no hay que olvidar el efecto del malonil-CoA

mencionado más arriba en este discurso. Dicho de otra manera, si se inhibe la formación de malonil-CoA por inhibir a su enzima formador, la acetil-CoA carboxilasa, se anula todo efecto de la leptina a través de la vía de STAT3. Análogos resultados se obtienen por sobre-expresión de la malonil-CoA decarboxilasa que produce una destrucción de malonil-CoA. Aunque exista mucha leptina en la sangre, la ausencia de malonil-CoA en el hipotálamo producida por cualquier manipulación de transferencia de genes o por acción farmacológica, anula el efecto anorexigénico de la leptina, aunque esté muy activa la señalización de STAT3. Ello refuerza la idea que más de un mecanismo trabaja a la vez en mantener el control del apetito tras la presencia de la leptina en la sangre, pero también indica que los niveles de malonil-CoA (y/o de CPT1) son los dominantes.

ACCIÓN OREXIGÉNICA DE LA GHRELINA

Además de las acciones anorexigénicas descritas anteriormente causadas por las hormonas insulina y leptina y por sustancias energéticas del metabolismo tales como glucosa y ácidos grasos, el organismo dispone de otro factor hormonal que provoca una acción contraria a las anteriores (acción orexigénica) y que se denomina ghrelina. Este polipéptido se produce en el estómago y allí mismo reacciona con un grupo octanoato siendo este hecho determinante para proporcionar acción hormonal efectiva. El propio estómago dispone de una O-acil transferasa específica para ligar el grupo octanoato. Los Premios Nobel Goldstein y Brown que son universalmente conocidos por sus elegantísimos trabajos sobre la regulación de síntesis de colesterol, han hecho incursiones bioquímicas en otros campos, como fue la resolución de la lipodistrofia congénita por bombeo de leptina al animal que la sufría (27). También en el tema de ghrelina estos dos científicos han mostrado su impronta de grandes científicos al ser ellos los que han clonado el enzima acilante de ligación de octanoato a la ghrelina.

Pronto se observó que la ghrelina activaba el apetito en roedores y humanos, promoviendo un enorme interés como agente diana sobre la que ejercer un tratamiento terapéutico anti-obesidad (52). La administración

sistemática de ghrelina produce ganancia de peso y adiposidad (53). Lo contrario también se ha observado: Pacientes obesos con el síndrome genético de Prader Willi tienen elevados los niveles de ghrelina sanguínea (54). En experimentos de supresión génica se ha observado que ratones KO del gen de ghrelina (55) o del receptor de ghrelina (56) son muy refractarios a tener obesidad temprana.

Desde un punto de vista funcional se sabe que la ghrelina circula por la sangre hasta el hipotálamo, donde se encuentran los receptores específicos que la ligan produciendo las señales que inducirán apetito en los animales. El mecanismo de acción hipotalámico de la ghrelina recuerda el de la acción de los ácidos grasos en el mismo órgano si bien con un recorrido opuesto. La ghrelina estimula la disminución de malonil-CoA hipotalámico y esto induce la activación de la CPT 1A con metabolización de los ácidos grasos de cadena larga, lo que de por sí es un estímulo para el aumento del apetito como ya mencioné al principio del discurso. Es asombroso comprobar que todos los variados agentes que influyen en el apetito tienen que ver en sus mecanismos de acción con el metabolismo lipídico hipotalámico: Glucosa, insulina, leptina, y los ácidos grasos todos son agentes que median su acción anorexigénica u orexigénica a través de la producción o destrucción de malonil-CoA y de la activación de CPT 1. Esta coincidencia metabólica está determinando acciones investigadoras concretas dirigidas a inhibir la acción de la CPT 1 bien a través de la producción de malonil-CoA o a través de fármacos con acción mecanística, análoga a la acción del malonil-CoA. Una acción investigadora de nuestro grupo va dirigida en esta dirección.

Desde un punto de vista mecanístico en detalle, hay que asignar a la ghrelina una doble acción dentro de las neuronas hipotalámicas responsables del control del apetito: Por una parte, la ghrelina estimula la acción de la AMP quinasa a través de un fenómeno de fosforilación de la proteína; por otra, reprime la expresión del gen de la Ácido Graso Sintetasa (FAS), que directamente disminuye la síntesis *de novo* de ácidos grasos de larga cadena, tipo palmítico, a la par que disminuye la concentración de malonil-CoA (57). Estos efectos, son a su vez, coincidentes con la acción del ayuno, que estimula la fosforilación también de la AMP quinasa y la Acetil-CoA carboxilasa. No es extraña esta coincidencia, pues precisamente el ayuno estimula a nivel de estómago la producción y secreción de ghrelina precisamente para acabar con el ayuno.

Para conocer en detalle el efecto del ayuno en la promoción del apetito se ha venido utilizando un compuesto denominado el Compuesto C que

inhibe la ruta de señalización de la AMP kinasa (57). El compuesto C al inhibir la AMP kinasa disminuye la fosforilación de la AMPK y de acetil-CoA carboxilasa, así como también produce la expresión de la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina (una de cuyas funciones es fosforilar la AMP kinasa). Naturalmente, la introducción de Compuesto C en el hipotálamo por inyección intracerebroventricular produce la anulación de efectos bioquímicos producidos por el ayuno en el hipotálamo, deduciéndose que los efectos sobre el apetito localizados en el Compuesto C se producen a través de su acción sobre la AMP Kinasa (disminución de actividad) y la Acetil-CoA Carboxilasa (aumento de actividad). También el Compuesto C disminuye la expresión del gen FAS, lo que permite suponer que la acción del ayuno en la disminución de la expresión de la FAS afecta el mecanismo dependiente de AMPK. El balance global de todos los efectos producidos por el compuesto C es el aumento de los niveles de malonil-CoA a pesar de que las ratas hayan sido ayunadas.

De un modo semejante a lo que el ayuno produce en el hipotálamo en relación con el apetito se produce por la acción de la ghrelina. Un primer experimento muy revelador es el que se muestra que cuando se inyecta icv ghrelina a ratas saciadas de comida, se induce un aumento sobreabundante de apetito y las ratas no paran de comer. A la vez, se observa un aumento de fosforilación de AMPK y de ACC manteniéndose los niveles aumentados de fosforilación a lo largo de seis horas. De nuevo, el compuesto C ayuda en la interpretación del mecanismo de acción de la ghrelina. Si se inyecta el compuesto C por vía intracerebroventricular a ratas alimentadas, la ghrelina no produce ningún efecto. Como el compuesto C lleva a cabo su efecto a través de su acción a través de la AMP kinasa, este dato mostró que la ghrelina efectúa su papel biológico a través de la ruta AMPK. Se llevaron a cabo experimentos complementarios de confirmación de la ruta AMPK en el mecanismo de acción de la ghrelina mediante la infección con adenovirus que contenían formas dominante negativas de AMPK alpha 1 y alpha 2. Los resultados mostraron que se bloqueó el mecanismo orexigénico de la ghrelina en el núcleo ventromedial.

La ghrelina produce otro efecto adicional, un tanto contradictorio. La ghrelina reprime la expresión de la Ácido Graso Sintetasa (FAS, fatty acid synthase) (57). Los estudios llevados a cabo por el Dr. Miguel López de la universidad de Santiago de Compostela son muy claros: La inyección intracerebroventricular, en el núcleo ventromedial, a la par que conduce a aumentos de apetito de forma inmediata, produce además, una disminu-

ción en los niveles de mRNA de FAS, y también de proteína FAS y de actividad enzimática FAS. Sorprende, por otra parte, que estos cambios no se observen en otros núcleos hipotalámicos como arcuato y paraventricular ni en otras áreas cerebrales como la amígdala, el estriado la habénula, varias zonas CA del hipocampo y el cortex motor, el cortex piriforme, el cortex sensorial, la sustancia nigra y la zona *incerta* en el tálamo. Yéndonos fuera del cerebro, la ghrelina también induce el apetito y la reducción de la expresión del gen FAS cuando se inyecta intraperitonealmente.

A fin de conocer si la expresión disminuida de FAS se producía cuando se aumentase el apetito por cualquier causa o no, se inyectó directamente Neuropeptido Y o la AgRP en el núcleo ventromedial. Esto produjo un aumento inmediato de apetito, pero los niveles de mRNA de FAS quedaron intactos. Ello determinó, que mecanísticamente no existe interrelación ente la expresión de FAS y el aumento de apetito, todo ello promovido por la ghrelina. Sin embargo, de los experimentos de Miguel López, si que parece claro que el efecto disminuïdor de la expresión de FAS promovido por el ayuno es mediado por la ghrelina. Sabido es que el ayuno promueve la secreción de ghrelina por parte del estómago y esta hormona disminuye la expresión de FAS en las neuronas FAS del núcleo ventromedial.

Uno podría extrañarse de que la ghrelina produzca disminuciones en la expresión del gen FAS. Más bien, uno debería haber esperado lo contrario. Si, como se sabe, la disminución de los niveles de malonil-CoA son responsables de la ganancia de apetito, uno esperaría que una abundancia de ghrelina en sangre, produjera un aumento en al expresión del gen FAS como una forma de disminuir los niveles de malonil-CoA en el hipotálamo, y concomitantemente se produciría el aumento de apetito. (El malonil-CoA es sustrato del enzima FAS y por ello, cuando aumenta la actividad enzimática, disminuyen los sustratos).

Comoquiera que los resultados expuestos han sido consistentemente observados, debe darse una explicación alternativa que explique por qué los niveles de FAS disminuyen y no aumenten, como sería lo aparentemente lógico. La acción de la ghrelina dura unas seis horas, pasadas las cuales, todos los metabolitos del núcleo ventromedial vuelven a sus concentraciones anteriores, entre ellos el malonil-CoA. La disminución de la expresión FAS puede estar ligada a la protección del sistema frente a una disminución exagerada por cualquier causa de los niveles de malonil-CoA, que podría ser nefasta para la fisiología normal del hipotálamo. Una disminución de la expresión FAS re-equilibra la tendencia de una exagerada disminución de

malonil-CoA, al evitar que se convierta en ácido palmítico en exceso, tal como se produce por la acción enzimática FAS. Tendría un efecto contrabalanceador de los niveles de metabolitos cerebrales para que no se vean sometidos a una disminución exagerada.

Otro tema de cierto carácter intrigante es comprobar que la disminución de FAS causada por la ghrelina se produce solo en el núcleo ventromedial. El núcleo ventromedial está anatómicamente y funcionalmente muy bien situado en el hipotálamo para integrar señales conducentes a la regulación del apetito, señales que proceden de neuronas de núcleos adyacentes y del cerebelo. En consecuencia, se puede afirmar que, además de controlar la biosíntesis de lípidos cerebrales, la FAS en el núcleo ventromedial puede jugar un papel adicional como sensor del estado nutricional.

APROXIMACIÓN FARMACOLÓGICA AL CONTROL DEL APETITO

El conocimiento de las bases moleculares del control del apetito, ha permitido en un próximo pasado la realización de mucha investigación para tratar de controlar el peso de los individuos obesos mediante el control del apetito. Tal como se ha expuesto, existen distintos componentes hormonales (insulina, leptina, ghrelina), y otros no mencionados, como adiponectina, resistina, visfatina, también que tienden a modificar el peso, y su consecuencia patológica más usual, la resistencia a la insulina y la diabetes. Todos, ejecutan su programa modificador del apetito a través de la modulación de los niveles de malonil-CoA, unos a la baja como ghrelina y otro al alza como insulina y leptina. A los componentes hormonales se suman los metabolitos energéticos como glucosa y ácidos grasos, que también modifican los niveles hipotalámicos de malonil-CoA. Con lo que, debido a esta unicidad de acción, la acción farmacológica más útil de disminuir el apetito se centra en aumentar los niveles de malonil-CoA. Conocido es también el hecho de que malonil-CoA inhibe la actividad enzimática CPT 1A y 1C, por lo que de modo indirecto se advierte que estas enzimas también son dianas (targets) de acción controladora del apetito. A este respecto, se

puede afirmar con carácter axiomático que cualquier inhibición de la actividad CPT1 conduce a la disminución del apetito y cualquier activación de la CPT1 conduce a aumento del apetito, del peso, y de la propensión a la obesidad. Los experimentos llevados a cabo de inyección intracerebroventricular de etomoxir, un conocido y eficaz inhibidor de la CPT1 así los muestran claramente. La toxicidad paralela de este producto desaconseja su uso farmacológico, si bien, en roedores ha sido muy útil como sustancia inhibidora de la actividad CPT1 a imitar.

En el año 2000 se publicó en Science un interesante trabajo del equipo del Dr Daniel Lane de la Johns Hopkins University de Baltimore, USA en el que mostraba que un compuesto inhibidor de la FAS, el C75, que inicialmente se había utilizado como un anticancerígeno, inyectado a ratones en el tercer ventrículo cerebral, les hacía perder peso muy rápidamente, al perder completamente el apetito (58). Las propiedades antitumorales del C75 se debían, precisamente a la inhibición de la actividad FAS. Los tumores necesitan tener un enzima FAS muy activo, por la necesidad de sintetizar ácido palmítico y otros ácidos grasos de larga cadena para la síntesis de fosfolípidos constitutivas de las membranas de las células en rápida expansión. Estos científicos observaron que la inhibición de FAS había producido un aumento de malonil-CoA y éste una inhibición de la CPT1. Esta inhibición de CPT1 preservaba la concentración de aciles-CoA hipotalámicos y ello constituía una señal marcadora de saciedad energética sanguínea, que forzaba a estimular la producción de sustancias anorexigénicas tipo POMC y CART, ya descritas en este discurso. Los autores a lo largo de los años 1990 habían desaconsejado el uso terapéutico del C75 como antitumoral, pues el animal se debilitaba progresivamente, no solo por el tumor cancerígeno sino por la acción debilitante del no comer. No obstante, a la vista de los resultados anorexigénicos del nuevo fármaco C75, parecía que el C75 podría ser utilizado como fármaco adelgazante.

Los autores no pudieron proponer el posible fármaco como fármaco, pues paralelamente a la observación del carácter inhibitorio de la actividad FAS causada por el producto, los autores reportaron que el C75 era un activador de la actividad enzimática CPT1 y ello impedía dar una respuesta molecular al nuevo producto, ya que las activaciones de la CPT1 conducían a activaciones del apetito. Nuestro grupo resolvió esta paradoja (59, 60), al observar que el C75, tanto in vitro como in vivo se convertía a pH suavemente alcalino en un aducto C75-CoA, y este compuesto era un inhibidor muy energético de la CPT1, incluso superior al propio malonil-CoA. De

forma que el efecto farmacológico del C75 era debido más a la inhibición de la CPT1 cuando se había transformado en el aducto C75-CoA que en su papel inhibitorio de la FAS, que, nosotros comprobamos que efectivamente lo era. Nuestro grupo está sintetizando, en colaboración con el grupo del Dr. Jordi García de la Facultad de Química, otros compuestos similares derivados del ácido paracónico, basando la inserción de grupos moleculares, según la indicación del Dr. Paulino Gómez-Puertas tras la modelización del conjunto [estructura terciaria molecular de la CPT1 y nuevo derivado]. Ello puede hacer crear nuevos fármacos, que serán protegidos por las correspondientes patentes de invención, tras observar su carencia de toxicidad y sus efectos anorexigénicos en experimentos en inyecciones hipotálamicas en roedores.

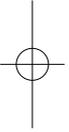
He dicho.



I



Discurso de Contestación
Excmo. Sr. Dr. D. Manuel López Pérez



I



Nunca pude imaginar que en mi carrera académica iba a tener la oportunidad de responder al Prof. D. Fausto García Hegardt en su entrada en la Academia de Farmacia "Reino de Aragón". No tenía razones para pensarlo; al Prof. García Hegardt lo conocí en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense cuando hacía allí sus oposiciones de Profesor Agregado de Bioquímica y Biología Molecular. Recuerdo perfectamente la brillantez de sus ejercicios en unas oposiciones que tenían nada menos que seis pruebas diferentes y que duraban dos o tres semanas. Recuerdo particularmente su ejercicio práctico en que expuso un proyecto que combinaba conocimiento de gestión empresarial con conocimiento bioquímico.

En aquel entonces yo no sabía que acabaría siendo Catedrático en la Universidad de Zaragoza, y mucho menos Presidente de una Academia de Farmacia de Aragón, en donde no existía Facultad de Farmacia hasta hace poco que se implantó en nuestra Universidad Privada "San Jorge".

Pues bien, esta inimaginable situación se ha acabado produciendo y ha dado lugar a muchas singularidades que también la acompañan. Por ejemplo, que el Prof. García Hegardt sea el primer académico de Aragón que es Catedrático de una Facultad de Farmacia, o que él disfrute tanto de serlo en una Academia de Farmacia de su tierra natal, y que lo sea hablando de la Regulación Hipotalámica del Apetito.

Querido amigo Fausto, nuestra Academia se honra en recibirte, y no puedo evitar decir que la Universidad de Zaragoza se honra en recibirte como académico aquí en su Paraninfo, antiguas Facultades de Medicina y Ciencias. Y además nos honra recibirte porque eres un investigador que ha marcado época en la investigación metabólica en España, que has creado una admirable escuela en la Bioquímica española y que todo esto lo hemos podido percibir claramente en tu lección de hoy.

Es curioso como te conocí sabiendo hablar de Bioquímica, Farmacia y Empresa y como hoy has abordado un tema del mayor interés biomédico y con una clarísima proyección y expectativas farmacéuticas aún por descubrir y aprovechar en el mundo terapéutico.

Querido amigo Fausto, eres acogido con alegría por nuestra Academia, la misma alegría que vemos en tu mujer y en tu familia, y en tantos vecinos, amigos y paisanos.

Muchas felicidades y muy bienvenido y recibido a ésta, tu Academia y a ésta, tu tierra.

MANUEL J. LÓPEZ PÉREZ.

Presidente de la Academia de Farmacia «Reino de Aragón».

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kopelman, P.G. (2000) Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-643
2. Spiegelman, B.M., Flier, J.S. (2001) Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531-543
3. Friedman, J.M. (2003) A war on obesity, not the obese. *Science* 299, 856-858
4. Flier, J.S. (2004) Obesity wars: Molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116, 337-350
5. Farooqi, I.S., O'Rahilly, S. (2005) Monogenic obesity in humans. *Annu. Rev. Med.* 56, 443-458
6. Calle, E.E., Kaaks, R. (2004) Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev Cancer* 4, 579-591
7. Lelliot, C., Vidal-Puig, A.J. (2004) Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28, S22-S28
8. Friedman, J.M., Halaas, J.L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770
9. Kalra, S.P., Dube, M.G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T.L., Kalra, P.S. (1999) Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr. Rev.* 20, 68-100
10. Horvath, T.L., Diano, S., Tschop, M. (2004) Brain circuits regulating energy homeostasis. *Neuroscientist* 10, 235-246
11. Schwartz; M.W., Woods, S.C., Porte, D. jr., Seeley, R.J., Baskin, D.G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671
12. Elias, C.F., Saper, C.B., Maratos-Flier, E., Tritos, N.A., Lee, C., Kelly, J., Tatro, J.B., Hoffman, G.E., Ollmann, M.M., Barsh, G.S., Sakurai, T., Yanaqisawa, M., Elmquist, J.K. (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J. Comp. Neurol.* 402, 442-459
13. Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J.A., King, P.J., Liu, X.H. (2001) The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol. Behav.* 74, 683-701
14. Stanley, S., Wynne, K., McGowan, B., Bloom, S. (2005) Hormonal regulation of food intake. *Physiol. Rev.* 85, 1131-1158
15. Hecherington, A., Ranson, S. (1942) The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions. *Am. J. Physiol.* 136, 609-617

16. Sternson, S.M., Shepherd, G.M., Friedman, J.M. (2005) Topographic mapping of VMH arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat. Neurosci.* 8, 1356-1363
17. King, B.M. (2006) The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol. Behav.* 87, 221-224
18. López, M., Lelliot, C.J., Tovar, S., Kimber, W., Gallego, R., Virtue, S., Blount, M., Vázquez, M-J, Finer, M., Powles, T., O'Pahilly, S., Saha, A.K., Diéguez, C., Vidal-Puig, A. (2006) Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes* 55, 1327-1336
19. Campfield, L.A. Smith, F.J., Burn, P. (1996) The OB protein (leptin) pathway – a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm. Metab. Res.* 28, 619-632
20. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human analogue. *Nature* 372, 425-432
21. Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J. Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sayker, S., Moriarty, A., Moore, K.L., Smutko, J.S., Mays, G.G., Wool, E.A., Monroe, C.A., Tepper, R.I. (1995) Identification and expression cloning of leptin receptor OB-R. *Cell* 83, 1263-1271
22. Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., Suzuki, R., Satoh, H., Tsuchida, A., Moroi, M., Sugi, K., Noda, T., Ebinuma, H., Ueta, Y., Kondo, T., Araki, E., Ezaki, O., Nagai, R., Tobe, K., Terauchi, Y., Ueki, K., Monokoshi, Y., Kadowaki, T. (2007) Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab.* 6, 55-68
23. Sethi, J.K., Vidal-Puig, A. (2005) Visfatin: the missing link between intraabdominal obesity and diabetes? *Trends Mol. Med.* 11, 344-3370
24. Bernard, C. *Leçons de Physiologie Experimentale Appliqué a la Medicine* Faites au College de France. Paris, France: Bailere et Fils, 1855, pp. 296-313
25. Coppari, R., Ichinose, M., Lee, C-E., Pullen, A.E., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Tang, V., Liu, S.M., Ludwig, T., Chua, S.C. Jr, Lowell, B.B., Elmquist, J.K. (2005) The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab.* 1, 63-72
26. Morton, G.J., Gelling, R.W., Niswender, K.D., Morrison, C.D., Rhodes, C.J., Schwartz, M.W. (2005) Leptin regulates insulin sensitivity via

- phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell Metab.* 2, 411-420
27. Shimomura, I., Hammer, r.E., Ikemoto, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1999) Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401, 73-76
 28. Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., Rossetti, L. (2002) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51, 271-275
 29. Morgan, K., Obici, S., Rossetti, L. (2004) Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutricionalmente regulated. *J. Biol. Chem.* 279, 31139-31148
 30. Lam, T.K., Poci, A., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Bryan, J.M., Aguilar-Bryan, L., Schwartz, G.J., Rossetti, L. (2005) Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat. Med.* 11, 320-327
 31. Gao, S., Zhu, G., Gao, X., Wu, D., Carrasco, P., Casals, N., Hegardt, F.G., Moran, T.H., Lopaschuk, G. (2011) Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 9691-9696
 32. Gao, S., Keung, W., Serra, D., Wang, W., Carrasco, P., Casals, N., Hegardt, F.G., Moran, T.H., Lopaschuk, G.D. (2011) Malonyl-CoA Mediates Leptin Hypothalamic Control of Feeding Independent of Inhibition of CPT-1A, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* Aceptado el 20 de abril de 2011. Publicado on line en 20/04/2011.
 33. Sierra, A.Y., Gratacós, E., Carrasco, P., Clotet, J., Ureña, J., Serra, D., Asins, G., Hegardt, F.G. y Casals, N. (2008) CPT 1C is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has Carnitine Palmitoyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 283, 6878-6885
 34. Wolfgang, M.J., Kurama, T., Dai, Y., Suwa, A., Asaumi, M., Matsumoto, S., Cha, S.H., Shimokawa, T., Lane, M.D. (2006) The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1C regulates energy homeostasis. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7282-7287
 35. Poci, A., Lam, T.K., Gutierrez-Juarez, R., Obici, s., Schwartz, G.J. Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., Rossetti, L. (2005) Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature*, 434, 1026-1031
 36. Obici, S., Zhang, B.B., Karkanias, G., Rossetti, L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat. Med.* 8, 1376-1382
 37. Obici, S., Feng, Z., Arduini, A., Conti, R., Rossetti, L. (2003) Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med.* 9, 756-761

38. He, W., Lam, T.K., Obici, S., Rossetti, L. (2006) Molecular disruption of hypothalamic nutrients sensing induces obesity. *Nat. Neurosci* 9, 227-233
39. Ross, R., Wang, P.Y., Chari, M., Lam, C.K., Caspi, L., Ono, H., Muse, E.D., Li, X., Gutierrez-Juarez, R., Light, P.E., Schwartz, G.J., Rossetti, L., Lam, T.K. (2008) Hypothalamic protein kinase C regulates glucose production. *Diabetes* 576, 2061-2065
40. Maher, F., Davies-Hill, T.M., Simpson, I.A. (1996) Substrate specificity and kinetic parameters of GLUT3 in rat cerebellar granule neurons. *Biochem. J.* 315, 827-831
41. Maher, F., Davies-Hill, T.M., Lisko, P.G., Henneberry, R.C., Simpson, I.A. (1991) Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3. *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 351-360
42. Pellerin, I. (2005) How astrocytes feed hungry neurons. (2005) *Mol. Neurobiol.* 32, 59-72
43. Lam, T.K., Gutierrez-Juarez, R., Poci, A., Rossetti, L. (2005) Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* 309, 943-947
44. Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M.J., Kaufman, E., Sokoloff, L. (2003) Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4879-4884
45. Parton, L.E., Ye, C.P., Coppari, R., Enriori, P.J., Choi, B., Zhang, C.Y., Xu, C., Vianna, C.R., Balthasar, N., Lee, C.E., Elmquist, J.K., Cowley, M.A., Lowell, B.B. (2007) Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired by obesity. *Nature* 449, 228-232
46. Borg, M.A., Tamborlane, W.V., Shulma, G.I., Sherwin, R.S. (2003) Local lactate perfusion of the ventromedial hypothalamus suppresses hypoglycemic counterregulation. *Diabetes* 52, 663-666
47. Brüning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Müller-Wieland, D., Khan, C.R. (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122-2125
48. Cone, R.D. (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* 8, 571-578
49. Van den Hoek, A.M., Voshol, P.J., Kamekamp, B.N., Buijs, R.M., Romijn, J.A., Havekes, L.M., Pijl, H. (2004) Intracerebroventricular neuropeptide Y infusion precludes inhibition of glucose and VLDL production by insulin. *Diabetes* 53, 2529-2534

50. Pocai, A., Morgan, K., Buettner, C., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Rossetti, L. (2005) Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. *Diabetes* 54, 3182-3189
51. Myers, M.G. (2004) Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog. Horm. Res.* 59, 287-304
52. Foster-Schubert, K.E., Cummings, D.E. (2006) Emerging therapeutic strategies for obesity. *Endocr. Rev.* 27, 779-793
53. Tschöp, M., Smiley, D.L., Helman, M.L. (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-913
54. Cummings, D.E., Clement, K., Purnell, J.Q., Vaisse, C., Foster, K.E., Frayo, R.S., Schwartz, M.W., Basdevant, A., Weigle, D.S. (2002) Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat. Med.* 8, 643-644
55. Wortley, K.E., Del Rincón, J.P., Murray, J.D., García, K., Iida, K., Thorner, M.O., Sleeman, M.W. (2005) Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J. Clin. Invest.* 115, 3573-3578
56. Zigman, J.M., Nakano, Y., Coppari, R., Balthasar, N., Marcus, J.N., Lee, C.E., Jones, J.E., Deysher, A.E., Waxman, A.R., White, R.D., Williams, T.D., Lachey, J.L., Seeley, R.J., Lowell, B.B., Elmquist, J.K. (2005) Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 115, 3564-3572
57. López, M., Lage, R., Saha, A.K., Pérez-Tilve, D., Vázquez, M.J., Varela, L., Sangiao-Alvarellos, S., Tovar, S., Raghay, K., Rodríguez-Cuenca, S., De Oliveira, R.M., Castañeda, T., Datta, R., Dong, J.Z., Culler, M., Sleeman, M.W., Álvarez, C.V., Gallego, R., Lelliot, C.J., Carling, D., Tschöp, M.H., Diéguez, C., Vidal-Puig, A. (2008) Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab.* 7, 389-399
58. Loftus, T.M., Jaworski, D.E., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., Ronnet, G.V., Lane, M.D., Kuhajda, F.P. (2000) Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288, 2379-2381
59. Bentebibel, A., Sebastian, D., Herrero, L., Lopez-Viñas, E., Serra, D., Asins, G., Gomez-Puertas, P., Hegardt, F.G. (2006) Novel effect of C75 on carnitine palmitoyltransferase I activity and palmitate oxidation. *Biochemistry* 45, 4339-4350
60. Mera, P., Bentebibel, A., López-Viñas, E., Cordente, A.G., Gurunathan, C., Sebastián, D., Vázquez, I., Herrero, L., Ariza, X., Gómez-Puertas, P., Asins, G., Serra, D., García, J., Hegardt, F.G. (2009)

